

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е. И. Шишацкая

«_____» _____ 2019 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ про- и антиоксидантной систем в плазме крови больных аденомой и
раком простаты

06.04.01 Биология

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель

_____ доцент, к.б.н. Н. М. Титова
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник

_____ Е. А. Карпенко
подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент

_____ доцент, к.б.н. Р.Н. Белоногов
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2019

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Обзор литературы.....	7
1.1 Активные формы кислорода и источники их образования.....	7
1.2 Окислительная модификация белков.....	9
1.3 Перекисное окисление липидов.....	11
1.3 Антиоксидантная система.....	13
1.3.1 Ферментативное звено антиоксидантной системы.....	14
1.3.2 Неферментативное звено.....	16
1.4 Аденома простаты.....	17
1.5 Рак простаты.....	19
2 Материалы и методы.....	24
2.1 Объект исследования.....	24
2.2 Определение содержания диеновых конъюгатов.....	25
2.3 Определение содержания малонового диальдегида.....	26
2.4 Определение содержания карбонильных производных белков.....	27
2.5 Определение активности супероксиддисмутазы.....	29
2.6 Определения содержания церулоплазмينا.....	30
2.7 Определение содержания восстановленного глутатиона.....	31
2.8 Определение активности глутатионпероксидазы.....	33
2.9 Определение активности глутатион- S-трансферазы.....	34
2.10 Определение содержания мочевой кислоты в плазме крови.....	35
2.11 Определение содержания белка в плазме крови.....	36
2.12 Статистическая обработка результатов.....	38
3 Результаты исследования и их обсуждения.....	39
3.1 Содержание прооксидантов в плазме крови больных аденомой и раком простаты.....	39
3.2 Активность ферментов плазмы крови, дисмутирующих	

супероксидный анион-радикал при заболеваниях аденомы и рака простаты.....	42
3.3 Состояние глутатинового звена антиоксидантной системы плазмы крови больных аденомой и раком предстательной железы.....	43
3.4 Содержание мочевой кислоты в плазме крови больных аденомой и раком.....	45
3.5 Расчет коэффициента окислительного стресса для больных ДППЖ и РПЖ.....	46
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	48
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	49
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	50

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Анализ про- и антиоксидантной систем в плазме крови больных аденомой и раком простаты» содержит 55 страниц текстового документа, 1 иллюстрацию, 7 таблиц, 60 использованных источников.

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, ПРООКСИДАНТЫ, ГЛУТАТИОН, ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМЫЕ ФЕРМЕНТЫ, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, ЦЕРУЛОПЛАЗМИН, МОЧЕВАЯ КИСЛОТА, АДЕНОМА ПРОСТАТЫ (ДГПЖ), РАК ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РПЖ)

Объект исследования: плазма крови условно здоровых людей и больных аденомой и раком простаты

Цель исследования – оценить состояние прооксидантной и антиоксидантной систем в плазме крови больных аденомой и раком простаты.

Задачи:

- Определить уровень прооксидантов в плазме крови больных аденомой и раком простаты;
- Исследовать состояние антиоксидантной системы плазмы крови больных аденомой и раком простаты;
- Рассчитать коэффициент окислительного стресса для больных доброкачественной гиперплазией и раком предстательной железы.

В результате проведенного исследования было выявлено, что коэффициент окислительного стресса у мужчин с аденомой простаты увеличен в 2,4 раза по сравнению со здоровыми людьми. У больных раком ПЖ 1-2 стадии данный показатель близок к единице, а на 3-4 стадии заболевания наблюдается увеличение в 5,3 раза. Измененный баланс прооксиданты-антиоксиданты свидетельствует об усилении окислительного стресса и, следовательно, может играть важную роль в канцерогенезе простаты.

ВВЕДЕНИЕ

В организме человека существует баланс между интенсивностью свободнорадикального окисления и активностью антиоксидантной защиты [1]. Нарушение баланса в результате повышения уровня окислительных процессов, либо недостаточно эффективного функционирования системы антиоксидантной защиты (АОС) свидетельствует о наличии окислительного стресса, являющегося одним из патогенетических механизмов, приводящих к развитию, так называемых свободнорадикальных патологий, к числу которых относятся и онкологические заболевания [2]. Рост опухоли сопровождается изменением показателей антиокислительной активности и окислительного стресса в опухоли, что отражается на состоянии органов и тканей организма в целом.

Анализ литературных данных об изменении характера окислительного стресса в организме больных аденомой и раком простаты свидетельствует об их неполноте и фрагментарности. Как правило, состояние окислительного стресса и активности АОС в них оценивается только по одному из продуктов окислительной модификации липидов – малонового диальдегиду, активности некоторых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза) и содержанию низкомолекулярных антиоксидантов.

Между тем более детальные исследования необходимы, поскольку в перспективе могут быть использованы в качестве дополнительных критериев при оценке тяжести патологического процесса, прогноза течения заболевания и выживаемости, улучшения качества диагностики заболевания, а адекватная и эффективная коррекция работы защитных систем организма может способствовать нормализации общего состояния больного.

Цель исследования – оценить состояние прооксидантной и антиоксидантной систем в плазме крови больных аденомой и раком простаты.

Исходя из цели, сформулированы следующие задачи:

1. Определить уровень прооксидантов: диеновых конъюгантов, малонового диальдегида и карбонильных производных белков у больных аденомой и раком простаты.

2. Исследовать состояние антиоксидантной системы плазмы крови больных аденомой и раком простаты.

3. Рассчитать коэффициент окислительного стресса для больных доброкачественной гиперплазией и раком предстательной железы.

Работа выполнена на базе кафедры медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, лаборатория клинической патофизиологии и аллергологии Красноярского научного центра СО РАН «НИИ медицинских проблем Севера» и является частью комплексных исследований по изучению механизмов развития оксидативного стресса при различных патологиях.

1 Обзор литературы

1.1 Активные формы кислорода и источники их образования

Активные формы кислорода (АФК) образуются в клетке в процессе различных окислительно-восстановительных реакций. Свободные радикалы обладают высокой реакционной способностью и легко переходят из одной формы в другую, окисляя при этом различные молекулы. Концентрация АФК в клетке очень мала. Высокие концентрации АФК в клетке – признак оксидативного стресса и причина гибели клеток. Последствия оксидативного стресса, обусловленного АФК, включают в себя перекисное окисление липидов клеточных мембран, разрыв нитей ДНК, окисление белков [3,4].

К основным формам АФК относят:

Таблица 1 – АФК и их функции

АФК	Место образования	Функции
Супероксид анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$)	Супероксид продуцируется в гладком эндоплазматическом ретикулуме, где локализован ряд цитохром-зависимых оксигеназ[5].	Антибактериальная функция [2]
Перекись водорода (H_2O_2)	В дыхательной цепи и в реакциях НАД(Ф)Н-оксидазы образуется супероксид анион-радикал, который очень быстро дисмутирует до перекиси водорода. [6].	Детоксикация ксенобиотиков [5]
Гидроксильный радикал ($\cdot OH$)	$Fe^{2+} + HOON = Fe^{3+} + HO\cdot + \cdot OH$ [2]	Несмотря на короткий полупериод жизни, обладает высокой реакционной способностью и реагирует с различными органическими веществами. [7].
Нитроксид (NO^*)	NO-синтаза	Фактор расслабления сосудов [2]

АФК генерируются во всех частях клетки. Наибольший вклад вносит дыхательная цепь митохондрий. Важна роль системы цитохрома P-450, локализованной в эндоплазматической цепи [8].

Активные формы кислорода возникают не только спонтанно, но и ферментативно (НАДФН-оксидаза дыхательного взрыва в плазматической мембране и ксантиноксидаза в гиалоплазме) [9].

Митохондриальная респираторная цепь является основным источником супероксидного анион-радикала, который способен быстро дисмутировать в другие формы свободных радикалов. Внутренняя митохондриальная мембрана содержит ряд ферментных комплексов, утечка электронов из которых приводит к образованию супероксидного анион-радикала.

Респираторный взрыв и НАДФН-оксидаза - процесс, посредством которого фагоцитарные клетки выполняют свою главную функцию – фагоцитоз, во время которого происходит активация НАДФН-оксидазы и выделения супероксидного анион-радикала во внеклеточное пространство или фагосомы.

Существует ряд различных ферментов, работа которых приводит к образованию свободных радикалов, к ним относят: липооксигеназы, миелопероксидазы, NO-синтазы и многие другие.

Липооксигеназы являются негемовыми ферментами железа, катализирующие диоксигенацию полиеновых жирных кислот, что приводит к образованию гидроперекисей.

Миелопероксидаза – фермент, локализованный в лизосомах нейтрофилов, макрофагов и моноцитов. Этот фермент хлорирует H_2O_2 до высокореактивного $HOCl$. Последний реагирует с H_2O_2 с образованием синглетного кислорода и хлорид-иона. Синглетный кислород, сам по себе, не является свободным радикалом, но обладает свойствами, аналогичными АФК благодаря своей электронной структуре.

Синтазы оксида азота представляют собой гемсодержащие монооксигеназы, которые генерируют NO. NO-синтазы катализируют окисление L-аргинина до промежуточного N-гидрокси-L-аргинин с последующим образованием L-цитруллина и $\cdot NO$. Оксид азота является слабым окислителем, но при сочетании с $O_2\cdot$ переходит в высокоактивный свободный радикал – $OONO$. Оксид азота и $OONO$ взаимодействуя между

собой, генерируют очень стабильные нитрит и нитрат ионы, которые накапливаются в клетках, что приводит к образованию высокореактивных промежуточных соединений, таких как $\cdot \text{NO}_2$, N_2O_3 или $\cdot \text{NO}$. Эти продукты вызывают нитрование и нитрозирование важных биологических макромолекул - ДНК, РНК, белков и липидов, тем самым нарушая их функцию. Например, 8-нитрогуанин, продукт нитрования ДНК и РНК, является мощным мутагеном и прооксидантом.

Ионы переходных металлов, такие как железо Fe^{2+} и медь Cu^+ способны вступать в реакцию Фентона, которая генерирует гидроксильный радикал из H_2O_2 при окислении до Fe^{3+} и Cu^{2+} соответственно. Вступая в реакции перекисного окисления липидов металлы, ускоряют окисление биологических макромолекул [10].

Долгое время считали, что АФК являются исключительно токсичными метаболитами, что требует наличия в клетке мощной антиоксидантной системы для борьбы с ними. По мере изучения их функциональной роли стало ясно, что АФК не всегда пагубно влияют на клетку. АФК могут принимать участие в физиологических процессах клетки - участвуют в процессах фагоцитоза, необходимы для синтеза ряда соединений, выполняют мессенджерные функции [6,11].

1.2 Окислительная модификация белков

В организме человека окисление белков может происходить ферментативно и неферментативно. И если ферментативное окисление является каталитической функцией многих ферментов и зачастую служит частью физиологических процессов нашего организма, то неферментативное — вызывает нежелательные эффекты, приводящие к различным патологиям [12].

Основными факторами, влекущими за собой окислительную модификацию белков (ОМБ), являются АФК. Аминокислоты и состоящие из них белковые макромолекулы, подвержены окислительному действию

свободных радикалов, что приводит к различным вариантам изменения их физико-химических свойств: модификация аминокислотных остатков, образование карбонильных групп, формирование белок-белковых сшивок и S-S-мостиков [13].

В условиях окислительного стресса наиболее часто ОМБ подвергаются такие аминокислоты, как аргинин, лизин, пролин. Изменения, индуцируемые АФК в белках, затрагивают не только первичную структуру, но и способны изменять вторичную и третичную структуру белков [14], что сопровождается нарушением структуры белковой глобулы с образованием крупных белковых агрегатов за счёт межмолекулярных связей (при действии оксидантов происходит нарушение нативной конформации ряда доменов белков, в результате чего, происходит увеличение числа гидрофобных остатков на поверхности глобул, что приводит к формированию крупных белковых конгломератов [15] или фрагментации белковой молекулы, в связи, с чем данные белки более подвержены протеолизу и конформационным изменениям. К наиболее подверженным ОМБ относят протеины, насыщенные тиоловыми группами [14]. Следствием ОМБ является инактивация различных ферментов [15].

Наиболее легко подвержены окислению АФК сульфгидрильные группы в цистеине и метионине с образованием сульфоновых и дисульфидных групп. Данный вид окисления частично обратим за счет восстановительной функции глутатиона.

Большинство окислительно модифицированных белков не восстанавливаются в результате ферментативной репарации и удаляются из клетки только за счет протеолиза. Нарушение эффективности внутриклеточного протеолиза или снижение эффективности апоптоза измененных клеток является причиной многих патологических состояний [16].

Карбонильные группы и гидроперекиси, образующиеся при окислении белков, могут служить показателями свободнорадикального окисления [13].

1.3 Перекисное окисление липидов

Липиды являются основным компонентом клеточных мембран и зачастую легко подвергаются окислению. Особенно чувствительны к перекисному окислению полиненасыщенные жирные кислоты – кислоты с большим числом ненасыщенных связей в их углеродной цепочке [7].

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) – физиологический процесс, постоянно протекающий в живых клетках. Однако избыточное количество АФК запускают каскад реакций, приводящий к дестабилизации и нарушению барьерных функций биологических мембран.

ПОЛ – многостадийный процесс, который включает в себя инициацию, развитие и обрыв цепи (рис. 1). Перекисное окисление липидов начинается с внедрения свободного радикала в липидный слой (инициация), который окисляет жирные кислоты с образованием липидного радикала, который, в свою очередь, вступает в реакцию с молекулярным кислородом, растворенным в среде. Таким образом, образуется новый свободный радикал. Этот радикал атакует следующий липид с образованием гидроперекиси липида и нового радикала. Процесс продолжается до тех пор, пока не произойдет обрыв цепи, в котором непосредственное участие принимает антиоксидантная система [7,17,18]. Наиболее важным антиоксидантом является витамин Е, поскольку является жирорастворимым витамином, обладает гидрофобными свойствами и способен накапливаться, что позволяет ему быстро и эффективно реагировать с липидными гидроперекисями, чем последние с соседними жирными кислотами [19, 20].

Перекисное окисление липидов приводит к поликонденсации-полимеризации липидов, а так же к образованию вторичных соединений – альдегидов, среди которых главным образом выделяют цитотоксичный малоновый диальдегид (МДА) и диеновые конъюгаты (ДК). Эти соединения используются в качестве маркеров в анализе перекисного окисления липидов [7].

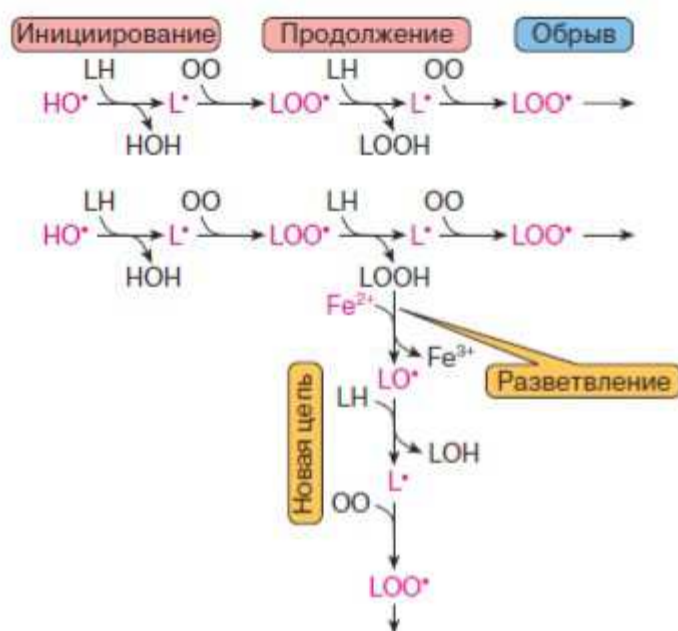


Рисунок 1 – Перекисное окисление липидов [2]

К первичным продуктам перекисного окисления липидов относятся диеновые гидропероксиды. Являются очень нестабильными молекулами и могут, подвергаясь вторичным реакциям, приводить к образованию эпоксидов, альдегидов, кетонов, спиртов и карбоксильных кислот, которые являются высокотоксичными веществами для организма [21].

«Малоновый диальдегид образуется в результате перекисного окисления жирных кислот, содержащих три или более двойных связей (линоленовая и арахидоновая кислоты, соответственно). МДА может способствовать перекрестному связыванию и полимеризации компонентов мембран, повреждая их, что приводит к нарушению свойств и функций, такие как текучесть, ионный транспорт, ферментативная и рецепторная активности, агрегирующая способность детерминантов клеточной поверхности и др.» [7].

«В плазме крови активные формы кислорода вызывают окислительную модификацию липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), в результате чего, последние становятся токсичными и эффективно захватываются макрофагами. Окислительная модификация ЛПНП проявляется в том, что происходит деградация полиненасыщенных жирных кислот с образованием коротких

реакционно-способных фрагментов, которые связываются с аполипротеином В» [13].

И тем не менее, в физиологических условиях некий уровень продуктов ПОЛ постоянно присутствует в клетках, так как продукты перекисного окисления липидов являются обязательным структурным элементом клеточных мембран. Продукты ПОЛ оказывают влияние на фазовое состояние липидного бислоя, усиливают гидратацию поверхности клетки, модифицируют проводимость мембраны для ионов и малых молекул и др. [21].

1.3 Антиоксидантная система

Защиту от агрессивного воздействия кислорода и его производных обеспечивает антиоксидантная система (АОС), которая обеспечивает связывание и модификацию радикалов [22].

Антиоксиданты – это молекулы, защищающие биологические системы от негативных эффектов, которые могут развиваться при окислительном стрессе.

Антиоксиданты участвуют в трех линиях защиты организма:

Первая линия защиты – это профилактические антиоксиданты, способны подавлять образование свободных радикалов. К ним относятся супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза и др. Данные антиоксиданты участвуют в нейтрализации перекиси водорода и гидропероксидов до воды и спиртов, что препятствует дальнейшему окислению.

Вторая линия защиты – антиоксиданты, которые удаляют активные радикалы, чтобы подавить инициацию цепи или прервать реакции распространения цепи ПОЛ. К ним относятся витамин С, мочевиная кислота, билирубин, альбумин и тиолы, являющиеся гидрофильными, а витамин Е и убихинол – липофильными антиоксидантами.

Третья линия защиты – антиоксиданты, участвующие в восстановлении окисленных молекул: протеиназы и пептидазы, присутствующие в цитозоле и в

митохондриях клеток млекопитающих. Они распознают, расщепляют и удаляют окислительно-модифицированные белки, тем самым предотвращают накопление окисленных белков [23].

Антиоксидантную систему организма человека можно условно разделить на специфическую и неспецифическую. Специфическая АОС направлена на разрушение АФК и продуктов их превращений. Неспецифическая АОС участвует в предотвращении условий и возможностей утечки электронов и генерации АФК. Система ингибирования избыточного количества АФК состоит из ферментативного и неферментативного звеньев [8].

1.3.1 Ферментативное звено антиоксидантной системы

От окислительного стресса клетки защищены взаимодействующими между собой антиоксидантами. Супероксид, высвобождаемый при окислительном фосфорилировании, сначала превращается в пероксид водорода, а затем восстанавливается с образованием воды. Этот путь детоксикации является результатом работы многочисленных ферментов.

Супероксиддисмутазы (СОД) – это класс близкородственных ферментов, которые катализируют дисмутацию супероксидного анион-радикала на кислород и перекись водорода. Ферменты СОД присутствуют почти во всех аэробных клетках и во внеклеточных жидкостях. У человека присутствуют три формы супероксиддисмутазы. СОД 1 находится в цитоплазме, СОД 2 в митохондриях, а СОД 3 является внеклеточным ферментом. Первая форма представляет собой димер, остальные являются тетрамерами [18].

Результатом деятельности СОД является интенсификация образования H_2O_2 , и без обезвреживания данного вещества, имело бы место усиление окислительных процессов в клетках. Потому в организме, сразу за дисмутацией супероксидного радикала, идёт удаление перекиси водорода, за счет работы фермента каталазы [18,21].

Каталаза выполняет функцию катализатора разложения перекиси

водорода до воды и кислорода. Перекись водорода является вредным побочным продуктом многих нормальных метаболических процессов: чтобы предотвратить повреждение, она должна быть быстро обезврежена [24].

Разложение H_2O_2 осуществляется также ферментативным редокс-циклом, который состоит из восстановленного глутатиона, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Однако, в отличие от каталазы, глутатионовый цикл способен работать при низких концентрациях перекиси [18,21,25].

Глутатионовое звено включает глутатион, глутатионредуктазу, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Глутатионпероксидаза представляет собой фермент, содержащий четыре селен-кофактора, которые катализируют расщепление перекиси водорода и органических гидропероксидов. У животных имеется, по меньшей мере, шесть разных изоформ глутатионпероксидазы. Глутатионпероксидаза 1 является наиболее распространенной и является очень эффективным поглотителем перекиси водорода, в то время как глутатионпероксидаза 4 наиболее активна с гидропероксидами липидов. Глутатион-S-трансферазы проявляют высокую активность с пероксидами липидов. Локализованы данные ферменты преимущественно в клетках печени, где участвуют в метаболизме эндогенных и экзогенных ксенобиотиков [23, 24].

Энзимы АОС характеризуются высокой избирательностью действия, направленного против определенных радикалов. Такие системы практически всегда выполняют свою функцию внутри клеток, так как большая молекулярная масса ферментов препятствует их выходу из клеток [26].

Помимо клеточных систем, существуют плазменные антиоксиданты, среди которых можно выделить высокомолекулярные вещества: альбумин, трансферин, ферритин, церулоплазмин и др.

Антиоксидантное действие церулоплазмينا, осуществляется этим белком, как самостоятельно, так и в комплексе с железопротеинами. В первом случае действие ЦП направлено на нейтрализацию супероксидного анион-радикала; во втором – на причину образования АФК, то есть на ионы металлов

переменной валентности.

Основная же доля плазмменных антиоксидантов принадлежит низкомолекулярным компонентам [21].

1.3.2 Неферментативное звено

Важной составляющей антиоксидантной системы является глутатион (GSH). GSH присутствует во всех компартментах клеток и является основным растворимым антиоксидантом, который участвует в нейтрализации перекисей липидов и поддерживает SH-группы белков в восстановленном состоянии [19, 27, 29, 30].

Антиоксидантные свойства глутатиона проявляются в защите от последствий окислительного стресса [31]. Глутатион в восстановленной форме, может функционировать, как антиоксидант многими способами: химически взаимодействовать с синглетным кислородом, супероксидом и радикалами гидроксила или на прямую разрушать свободные радикалы; стабилизировать мембранную структуру путем перемещения ацилпероксидов, образующихся в результате перекисного окисления липидов [23].

GSH является кофактором таких ферментов, как глутатионпероксидаза и глутатион-S-трансфераза, которые обезвреживают продукты окислительного модификации липидов [32]. Активность глутатионпероксидазы и скорость утилизации перекиси водорода напрямую зависят от концентрации восстановленного глутатиона в клетке. Конъюгирование ксенобиотиков и удаление пероксидов липидов клеточных мембран, осуществляемое глутатион-S-трансферазой, не происходит без участия GSH [33].

Не менее важную роль в организме играют витамины. Аскорбиновая кислота или витамин С, который является восстановителем, может снижать и, следовательно, нейтрализовать активные формы кислорода. В клетках витамин С поддерживается в восстановленной форме за счет реакции с глутатионом [24].

Витамин Е – это общее название токоферолов и токотриенолов, которые являются жирорастворимыми витаминами с антиоксидантными свойствами. Наиболее важный гидрофобный антиоксидант - α -токоферол - защищает мембраны от окисления путем взаимодействия с липидными радикалами, образующимися в цепной реакции перекисного окисления липидов. Он удаляет промежуточные свободные радикалы и препятствует продолжению реакции окисления. В результате этой реакции образуются окисленные α -токофероксильные радикалы, которые восстанавливаются другими антиоксидантами, такими как аскорбат, ретинол или убихинол [25].

Наиболее активным естественным низкомолекулярным антиоксидантом является мочевая кислота, которая составляет примерно половину антиоксидантной способности плазмы крови [34]. У человека концентрация урата в плазме крови, как конечного продукта метаболизма пуринов, может достигать больших значений до 0,6 мМ, что в 5-10 раз выше содержания аскорбата в плазме крови.

Мочевая кислота эффективно нейтрализует синглетный кислород, гидроксильный радикал и пероксильные радикалы [21,35].

1.4 Аденома простаты

Аденома предстательной железы – полиэтиологическое заболевание, проявляющееся увеличением размеров предстательной железы и нарушением мочеиспускания [36].

Доброкачественная гиперплазия предстательной железы представляет собой ограниченный капсулой узел, расположенный в толще органа, который состоит из эпителиальной паренхимы и соединительнотканной стромы. Зачастую эпителий в узле способен продуцировать секрет, в результате накопления которого могут образовываться кистозные полости. Гистологические исследования простаты наряду с разрастанием железистой ткани могут выявить фиброзные и мышечные разрастания (фиброаденома и

аденома), что, в свою очередь, приводит к увеличению массы железы от 30 до 200 и более граммов [37,38,39].

«Различают три формы доброкачественной гиперплазии предстательной железы в зависимости от направления роста узлов:

- внутрипузырная форма - рост направлен в просвет мочевого пузыря;
- подпузырная форма – рост направлен в сторону прямой кишки (встречается наиболее часто);
- ретротригональная форма - рост направлен под мочепузырный треугольник (встречается редко)»[38,40].

Существует несколько теорий развития доброкачественной гиперплазии предстательной железы и наибольшее распространение получила теория гормонального дисбаланса, связанная с возрастными изменениями, происходящими в организме мужчин в возрасте от 50 лет. Согласно данной теории эстрогенно-андрогенного дисбаланса, гиперплазия развивается постепенно из периуретральных желез и приводит к увеличению предстательной железы и гиперплазии железистого эпителия. [38,41].

«Снижение уровня андрогенов часто развивается при любом системном окислительном стрессе, который способен как напрямую уменьшать тестикулярный синтез тестостерона (пролактин, кортизол и избыток катехоламинов – основные гормональные регуляторы стрессовых реакций, выступающие как антагонисты тестостерона), так и способствовать нарушению периферической рецепции к тестостерону на клеточном уровне. Избыточная и/или длительная активация симпато-адреналовой системы на фоне такой неблагоприятной гормональной перестройки способна привести к нарушению обмена биогенных аминов в ткани железы, вызывающих различные нарушения кровообращения, запуская самые ранние доклинические стадии заболеваний, включая ДГПЖ» [41].

«В стромальных клетках простаты из тестостерона синтезируется дигидротестостерон (ДТС), усиливающий транскрипцию в этих же клетках. Он

индуцирует в них синтез разных пептидных факторов роста (ПФР), их рецепторов и 5-альфаредуктазы. Синтезировавшиеся дигидротестостерон и пептидные факторы роста действуют аутокринно на стромальные клетки, и паракринно влияют на эпителиальные клетки ПЖ, усиливая в них синтез РНК, белков, в том числе ПФР и простатического специфического антигена (ПСА). Совокупность данных факторов приводит к ускоренной пролиферации эпителиальных клеток» [41].

Повышенное содержание ДТС в простате, вызванное возрастными или другими факторами, может быть одним из пусковых механизмов доброкачественных или злокачественных гиперпластических процессов.

«При ДГПЖ отмечаются нарушения мочеиспускания: его учащение, вначале преимущественно ночью, вялость струи мочи, чувство неполного опорожнения мочевого пузыря, прерывистость струи мочи. Под влиянием различных факторов может наступать острая задержка мочеиспускания. Клинические проявления нарушения мочеиспускания при ДГПЖ делятся на две группы:» [41]

1. «Обструктивные симптомы обусловлены разрастанием гиперплазированной ткани предстательной железы;
2. Ирритативные – повышением активности $\alpha 1$ -адренорецепторов предстательной железы, шейки мочевого пузыря и простатического отдела уретры, нарушением метаболических процессов в ткани простаты, ведущим к возникновению расстройств кровообращения этих органов и асептическому воспалению» [38].

1.5 Рак простаты

Предстательная железа – непарный андрогензависимый орган, расположенный ниже мочевого пузыря у мужчин. Простата отвечает за выработку секрета, который является составной частью спермы.

«Рак простаты тесно связан с возрастом и многими другими факторами

риска, такие как раса, вредные привычки и неправильная диета. Показано, что одна из основных причин рака простаты - это накопление определенных мутаций, возможно, в результате длительного воздействия окислительного стресса на ткань» [42,43].

Условия окружающей среды, курение, потребление алкоголя может увеличить окислительный стресс, что, в свою очередь, способно привести к повреждению ДНК. Организм человека обладает антиоксидантной защитой, которая контролирует разрушающее воздействие естественных и экологических окислительных метаболитов [43].

Превалирование прооксидантов над антиоксидантами приводит к дисбалансу в организме, что способствует накоплению и ускорению окислительного повреждения тканей [42].

«Воспалительный процесс рассматривают как фактор риска развития РПЖ. Связь между канцерогенезом и предшествующим ему хроническим воспалением проявляется в повышенном общем уровне мутагенности в очаге хронического воспаления (или мутагенном потенциале воспаления), усиленном вследствие образования ключевых молекул — участников провоспалительных сигнальных каскадов, участия в канцерогенезе провоспалительного клеточного микроокружения. Мутагенный потенциал воспаления — это свободные радикалы, высокореактивные формы кислорода и азота, образуемые макрофагами и другими фагоцитами в очагах хронического воспаления. Свободные радикалы могут прямо или опосредованно реагировать с ДНК эпителиальных и стромальных клеток и вызывать различные генетические мутации»[44,45].

«Доказано, что в регуляции канцерогенеза клеток простаты играют большую роль гормональные сигнальные каскады. Эмбриональное развитие простаты находится в полной зависимости от синтеза тестостерона. На этой же стадии происходит превращение тестостерона при участии 5- α -редуктазы в более активный андроген — 5-дигидротестостерон (ДТС), который и определяет морфогенез простаты. Вторым важным элементом — андрогеновый

рецептор [46,47,49,49]. Андрогеновые рецепторы принимают немаловажное участие в регуляции синтеза ПСА. Как известно, ПСА — гликопротеид, относящийся к классу сериновых протеиназ, который в норме секретируется в протоки простаты, обеспечивая протеолитическую деградацию высокомолекулярных белков, синтезируемых в семенных пузырьках, предотвращая коагуляцию семенной жидкости. Уровень ПСА в неизменной предстательной железе примерно в 10^6 раз выше, чем в плазме крови. При развитии РПЖ уровень ПСА в плазме крови повышается за счет структурных нарушений в протоках простаты. На фоне трансформации эпителиальных простатических клеток ПСА активно секретируется во внеклеточную жидкость и попадает в общий кровоток. Андрогеновые рецепторы регулируют экспрессию гена, отвечающего за продукцию ПСА»[48,49].

«Возникновение РПЖ — многоступенчатый процесс. Последовательное развитие от нормальной клетки к микроскопическому новообразованию, локальному, а затем к метастатическому раку ПЖ включает в себя активацию онкогенов, уничтожение подавляющих генов (tumor suppressor genes) и потерю генов, подавляющих распространение опухоли (invasion suppressor genes)» [48].

Рак предстательной железы (РПЖ) имеет множество очагов роста и в большинстве случаев локализуется в периферической зоне, около 25 % — центральной и реже всего встречается в переходной зоне предстательной железы. Наиболее распространенной злокачественной опухолью ПЖ является ацинарная аденокарцинома [51].

«Классификация рака предстательной железы по системе градации Глисона основывается на разнице железистых структур опухоли.

Выделяют 5 степеней градации:

1. Опухоль состоит из небольших однородных желез с минимальными изменениями ядер;
2. Опухоль состоит из скоплений желез, все еще разделенных стромой, но расположенных ближе друг к другу;

3. Опухоль состоит из желез различного размера и строения и, как правило, инфильтрирует строму и окружающие ткани;

4. Опухоль состоит из явно атипичных клеток и инфильтрирует окружающие ткани;

5. Опухоль представляет собой «слои недифференцированных атипичных клеток» [42, 52, 53, 54].

«К симптомам рака предстательной железы относят:

- Функциональные расстройства оттока мочи - частые болезненные позывы, ощущение неполного опорожнения мочевого пузыря, трудности в начале мочеиспускания, и недержание мочи.

- Симптомы, обусловленные прорастанием опухоли за пределы капсулы предстательной железы. Боль в области промежности и лобка, над лобковой костью, добавляется гематурия, примесь крови в эякуляте. Возможна эректильная дисфункция.

- Признаки метастазирования – появление болей в костях (чаще в пояснице), значительная потеря веса, анемия, отечность нижних конечностей» [54].

Диагностика рака предстательной железы включает в себя:

- «Тест на ПСА крови – гликопротеин, который продуцируется секреторным эпителием предстательной железы. В физиологических условиях концентрация ПСА в сыворотке крови не превышает 2,5-4 нг/мл. При раке простаты, доброкачественной гиперплазии, простатите и других патологических состояниях, сопровождающихся нарушением барьерной функции базального слоя клеток и базальной мембраны простатических желез, что приводит к повышению уровня ПСА в плазме крови.

- Пальцевое ректальное исследование (ПРИ) в типичных случаях выявляет увеличение, уплотнение и асимметрию долей предстательной железы; поверхность простаты становится неровной, «бугристой». Любое пальпируемое узловое образование в предстательной железе является показанием для выполнения трансректальной биопсии под контролем ТРУЗИ.

- Трансректальное ультразвуковое исследование (ТРУЗИ) предстательной железы.
- Биопсия предстательной железы – получение проб ткани предстательной железы прицельно из предполагаемых опухолевых очагов»[54].

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служила плазма крови 43 условно здоровых мужчин (контрольная группа), 46 больных ДГПЖ и 33 – раком предстательной железы. Средний возраст исследуемых составил 63 ± 5 лет. От каждого пациента было получено подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАН.

Кровь забиралась натошак из локтевой вены в вакутейнеры с гепарином. Цельную гепанизированную кровь центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. После центрифугирования плазму осторожно отбирали и хранили при температуре - 20°C.

Диагностика доброкачественной гиперплазии предстательной железы и рака простаты у мужчин проводилась в поликлинике Красноярского научного центра СО РАН и КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского».

Клиническое значение имеет определение простатспецифического антигена, соотношения свободного и связанного ПСА в плазме. Если данное соотношение не превышает 10%, предполагается рак ПЖ. При достижении 25% - доброкачественная гиперплазия предстательной железы.

Нормальное сывороточное содержание ПСА не превышает 4 нг/мл (в возрасте 70 лет — до 6,5 нг/мл), при этом 10 % находится в сыворотке в свободной форме, 90 % связано с белками. Диагностическое значение маркера характеризуют следующие данные: ПСА 4—10 нг/мл — подозрение на РПЖ, ПСА 10—20 нг/мл — высокий риск РПЖ, ПСА 20—50 нг/мл — риск диссеминированного РПЖ, ПСА 50—100 нг/мл — высокий риск лимфометастазов и метастазов в отдаленные органы, ПСА более 100 нг/мл — всегда метастатический РПЖ [50,54,55,56].

Пациенты с диагнозом рак простаты были разделены на 2 группы, в первую группу вошли пациенты с 1 и 2 стадией ($n = 21$), а вторую – 3 и 4 стадией ($n = 13$) развития патологического процесса.

2.2 Определение содержания диеновых конъюгатов

«Вследствие π - π переходов спектры конъюгированных гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот характеризуются интенсивным поглощением в ультрафиолетовой области спектра с максимумом при 232–234 нм.

Реактивы

1. Гептан-изопропанольная смесь в соотношении 1:1.
2. 0,74 %-ный водный раствора KCl.

Ход определения:

Оценку содержания диеновых конъюгатов проводят в плазме крови. Для этого липиды экстрагируют стократным избытком смеси растворителей. В гомогенизатор вносят 0,1 мл плазмы крови, добавляют 5 мл изопропилового спирта и тщательно растирают до получения гомогенной суспензии. Содержимое гомогенизатора количественно переносят в мерную центрифужную пробирку, в которую затем добавляют 5 мл гептана.

Экстракт центрифугируют в течение 10 минут при 1700 g . Надосадочную фракцию переносят в градуированную пробирку и добавляют 1/5 объема раствора KCl для отмывки липидного экстракта от нелипидных примесей. После тщательного встряхивания образовавшаяся эмульсия расслаивается на две прозрачные фазы. В гептановом экстракте (верхняя фаза) измеряют спектрофотометрически содержание сопряженных диенов в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против гептана.

Расчет количества ДК производят с учетом молярного коэффициента экстинкции $27000\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ и выражали в мкмоль на 1 грамм белка или на 1 л плазмы крови» [57].

Расчетная формула:

$$C = \left(\frac{E}{\varepsilon} \right) * 101, \text{ где:}$$

C – концентрация карбонильных групп в плазме крови;

E – оптическая плотность образца;

ε - коэффициент молярной экстинкции;

101 – фактор разведения.

2.3 Определение содержания малонового диальдегида

«В липидных системах в результате ПОЛ образуется малоновый диальдегид (МДА), взаимодействие которого с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) приводит к образованию хромогена с максимумом поглощения в красной области видимого спектра при длине волны 532 нм.

Реактивы:

- 1) 0,9%-ный раствор NaCl (физиологический раствор),
 - 2) 30%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ),
 - 3) 0,1М раствор динатриевой соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА),
 - 4) 0,05 н раствор NaOH,
 - 5) 1%-ный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК),
- приготовленный на 0,05 н растворе NaOH.

Ход определения:

Последовательность приготовления проб и план действий при подготовке проб для измерения содержания малонового диальдегида представлены в табл.3.

Таблица 2– Порядок внесения реагентов в пробу (мл)

Реагент	Опытная проба	Контрольная проба
Физиологический раствор	0,8	0,8
Дистиллированная вода	-	0,2
Плазма крови	0,2	-
ТХУ	0,5	0,5
Центрифугировали 15 мин при 1700g, отбирали супернатант		
Супернатант	1,0	1,0
ЭДТА	0,075	0,075
ТБК	0,25	0,25
Содержимое пробирок перемешивали и ставили в кипящую водяную баню на 15 мин. Затем пробирки охлаждали до комнатной температуры		

Измеряли поглощение опытной пробы против контрольной на спектрофотометре при 532 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см.

Расчет содержания МДА проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равного $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и выражали в мкмоль/л плазмы, либо в мкмоль/г белка.

$$C = \frac{D_{532} * V_{p.c} * F * 1000}{V_{np} * \epsilon * d * Pr}, \text{ где:}$$

C – содержание МДА, мкмоль/г белка

D_{532} – оптическая плотность при длине волны 532 нм;

$V_{p.c.}$ – объем реакционной смеси (1,325 мл);

F – фактор разведения (7,5);

ϵ – коэффициент молярной экстинкции образовавшегося хромогена ($1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$);

$V_{np.}$ – объем супернатанта, используемый для определения содержания МДА (1 мл);

d – длина оптического пути кюветы (1 см);

$1000/Pr$ – коэффициент пересчета на г Pr» [57].

2.4 Определение содержания карбонильных производных белков

«Метод основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных

остатков белков с 2,4-динитрофенил гидразином (2,4-ДФГ) с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразонов (ДНФ-производные).

Реактивы

1. 20 %-ный раствор ТХУ (трихлоруксусной кислоты).
2. 2Н раствор HCl.
3. 0,2 %-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина, приготовленный на 2 н растворе HCl.
4. Этанол.
5. Этилацетат.
6. 8 М раствор мочевины.

Ход определения:

Плазму крови разводят дистиллированной водой (1:50). Для анализа готовят две пробы: контрольную и опытную, в которые вносят 0,1 мл разведенной плазмы (содержащие 0,7–1,0 мг белка) и 0,9 мл 20 %-ного раствора ТХУ для осаждения белков. К денатурированным белкам приливают в опытную пробу 1 мл 0,2 %-ного 2,4-ДФГ, а в контрольную – только 2Н HCl. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре образцы центрифугируют 20 минут при 3000 g. Супернатант удаляют; осадок трижды промывают смесью растворителей (этанол – этилацетат в соотношении 1:1) для экстракции липидов и 2,4-ДФГ, который не прореагировал с карбонильными группами окисленных белков. Предварительно подсушив, промытый осадок растворяют в 2,5 мл 8 М раствора мочевины, выдерживая в кипящей бане в течение 5 минут до полного растворения. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрируют спектрофотометрически при длине волны 370 нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против контроля.

Уровень карбонильных групп окисленных белков рассчитывают, используя коэффициент молярной экстинкции, равный $21,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ для ДНФ-производных и выражают в мкмоль/г белка

Расчетная формула:

$$C = \frac{E * 20 * 10^6}{22000 * Pr}, \text{ где:}$$

C – концентрация КП в плазме крови, в мкмоль/г белка;

E – оптическая плотность;

20 - разведение плазмы крови;

22000 – коэффициент молярной экстинкции;

10^6 – перевод концентрации от моль к мкмоль» [57].

2.5 Определение активности супероксиддисмутазы

«Принцип метода: Определение активности СОД основано на ингибировании реакции аутоокисления адреналина в присутствии СОД в щелочной среде вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов.

Реактивы:

1) этанол-хлороформная смесь (2:1).

2) 0,2 М бикарбонатный буфер, pH 11.

3) 5,46 мМ раствор адреналина (0,1% аптечный раствор).

Приготовление бикарбонатного буфера: 2,12 г Na_2CO_3 , 0,168 г NaHCO_3 , 0,074 г ЭДТА, растворить в дистиллированной воде (довести до отметки 200 мл); pH довели до нужного значения добавлением NaOH (конц).

Ход определения:

В пробирку вносят 50 мкл плазмы и 450 мкл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C . Добавляли 250 мкл этанол-хлороформной смеси, устраняющей мешающее влияние Pr. Далее перемешивали пробы и оставляли инкубироваться при комнатной температуре 10 мин. Полученную суспензию перемешивали и центрифугировали 10 мин при 6000g. Для определения СОД использовали супернатант.

Готовили контрольную и опытные пробы по схеме, представленной в табл. 2.

Таблица 3 – Порядок внесения реагентов в пробу, мл

Реагент	Контроль	Опыт
Бикарбонатный буфер	3	3
Дистиллированная вода	0,05	-
Супернатант	-	0,05
Раствор адреналина	0,15	0,15
Раствор адреналина добавляли в пробу непосредственно перед измерением оптической плотности		

Изменение оптической плотности регистрировали в течение 3-х минут каждые 30 секунд при длине волны – 347 нм в кювете с толщиной слоя 1,0 см.

Для расчета активности использовали показатели величины поглощения контрольной и опытной проб. Активность СОД выражают в усл. ед.* мин/л, либо в усл. ед.* мин/г Pr.

$$Ед. активности \frac{СОД}{г} = \frac{\left(\frac{E_x - E_o}{E_x}\right) * 100 \% * F * V * 1000}{50 * v * d * Pr}, \text{ где}$$

$$\frac{\frac{E_x - E_o}{E_x} * 100 \%}{50} - \text{единица активности, } 50\% \text{ ингибирование реакции}$$

окисления адреналина;

V – общий объем инкубационной пробы (3,2 мл);

F – фактор разведения (15);

v – объем супернатанта, используемого для определения активности СОД (0,05 мл);

d – длина оптического пути кюветы (1,0 см);

1000/Pr – коэффициент пересчета на г Pr (не используется при расчёте на л плазмы)» [57].

2.6 Определения содержания церулоплазмينا

«Принцип метода основан на окислении р-фенилендиамина при участии

церулоплазмина (ЦП).

Реактивы:

1. 0,4 М ацетатный буфер (pH 5,5), приготовленный путем смешивания растворов 1 и 2 (в соотношении 9:1). 1-й раствор – 55,44 ацетата натрия помещали в мерную колбу на 1 л и доводили до метки. 2-й раствор – 22,6 мл ледяной уксусной кислоты растворяли и доводили до метки 1 л дистиллированной водой.

2. 1,3%-ный раствор фтористого натрия.

3. 0,5%-ный раствор солянокислого р-фенилендиамина.

Ход определения:

В контрольную и опытную пробы вносим по 0,1 мл плазмы и 8 мл ацетатного буфера. В контрольную пробирку добавляем 2 мл раствора фтористого натрия (для инактивации ферментативной активности церулоплазмина). Затем в пробирки вносят по 1 мл раствора солянокислого р-фенилендиамина. Пробирки встряхивают, и помещаем в термостат и инкубируют в течении часа. После инкубации во все пробирки, (кроме контрольной), добавляют по 2 мл раствора фтористого натрия. Содержимое пробирок перемешивают, переносят в холодильник на 30 минут. Пробы колориметрируют против контроля в кюветах с толщенной 1,0 см при длине волны 530 нм.

Расчеты:

$C = D \cdot 875$ мг/л, где

D – значение оптической плотности;

875 – коэффициент пересчета;

C – концентрация церулоплазмина в мг/л» [55].

2.7 Определение содержания восстановленного глутатиона

«Принцип метода основан на взаимодействии восстановленного глутатиона с 5',5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБК), с

образованием окрашенного в желтый цвет тионитрофенильного аниона (ТНФА).

Реактивы:

1. Осаждающий раствор (1,67 г ледяной ортофосфорной кислоты; 0,2 г ЭДТА и 30 г хлористого натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки 100 мл);
2. Фосфатный буфер (0,3 М Na_2HPO_4);
3. 1 % раствор цитрата натрия
4. 0,02 % раствор 5',5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБК), приготовленный на 1 % растворе цитрата натрия.

Ход определения:

Для определения добавляли 0,1 мл плазмы крови к 0,9 мл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C. Для осаждения белков добавляли 1,5 мл осаждающего раствора. Пробы тщательно перемешивали и после 20-минутного стояния при комнатной температуре фильтровали через крупнопористый фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным и бесцветным.

В спектрофотометрическую кювету с толщиной слоя 1,0 см помещали 0,5 мл фильтрата, добавляли 2,0 мл фосфатного буфера. Поскольку раствор ДТНБК имеет слабо-желтую окраску, параллельно с опытной пробой готовили контрольную, содержащую вместо фильтрата осаждающий раствор, разведенный дистиллированной водой в отношении 2:5. Пробы фотометрировали до и после добавления ДТНБК. Затем в контрольную и опытную пробы вносили по 0,25 мл раствора ДТНБК. Сразу же после перемешивания должна появиться желтая окраска из-за образования дисульфида глутатиона с ДТНБК. Пробы фотометрировали при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 1,0 см против воздуха [58].

Содержание восстановленного глутатиона рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{\frac{E_2 - E_1}{13600} * F * 138 * 1000}{Pr}, \text{ где}$$

C - концентрация восстановленного глутатиона в ммоль/г Pr.

E_1 - оптическая плотность опытной пробы до добавления ДТНБК;
 E_2 - оптическая плотность опытной пробы после добавления ДТНБК;
138 - разведение эритроцитов в реакционной пробе;
1000 - коэффициент для пересчета концентрации глутатиона от молярной к миллимолярной;
 F - отношение оптической плотности контрольной пробы до добавления ДТНБК (E_1) и после добавления (E_2)» [57].

2.8 Определение активности глутатионпероксидазы

«Глутатионпероксидаза (GPO) катализирует реакцию взаимодействия глутатиона с гидроперекисью трет-бутила (ГПТБ).

Принцип метода: активность фермента оценивали по изменению содержания GSH в пробах до и после инкубации с модельным субстратом в ходе цветной реакции с ДТНБК.

Реактивы:

1. 0,1 М трис-HCl буфер с 0,01%-ным содержанием ЭДТА, pH=8,5
2. Сложный буфер (78 мг азида натрия, 100 мг восстановленного глутатиона растворяют в 100 мл 0,1 М трис-HCl буфера с 0,01%-ным содержанием ЭДТА pH=8,5)
3. 0,14 %-ный раствор ГПТБ
4. 20 %-ный ТХУ
5. Абсолютный метанол
6. 0,4%-ный раствор ДТНБК, приготовленный на абсолютном метаноле

Ход определения:

Плазму крови смешивают с охлажденной до 0 °С водой в соотношении 1:200. 0,2 мл смешивают с 0,73 мл сложного буфера и термостатируют 10 минут при 37 °С. Реакцию инициируют внесением в реакционную смесь 0,07 мл раствора ГПТБ через 5 минут инкубации реакцию останавливают добавлением

0,2 мл раствора ТХУ. В контрольные пробы раствор ГПТБ вносят после осаждения белка ТХУ. Полученные пробы центрифугируют при 1700g в течение 10 минут. Супернатант используют для определения количества восстановленного глутатиона. Для этого к 0,1 мл супернатанта добавляют 2,65 мл 0,1 М трис-НСl буфера и 0,025 мл раствора ДТНБК. После перемешивания пробы фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против дистиллированной воды. Активность фермента в эритроцитах выражают в мкмоль GSH, окисленного за 1 минут на грамм Pr, используя коэффициент молярной экстинкции ($13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии восстановленного глутатиона с ДТНБК.

Активность рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{\Delta C * V_{pc} * 1000}{V_{np} * \epsilon * Pr * t}, \text{ где:}$$

A - активность фермента, мкмоль/мин на 1 г Pr;

ΔC – разность концентраций GSH в опытной и контрольной пробах;

V_{np} – объем супернатанта, используемый для определения концентрации GPO (0,1 мл)

t – время инкубации (5 минут);

$V_{p.c.}$ - объем реакционной смеси (2,775 мл);

$1000/Pr$ – коэффициент пересчета на г/Pr» [57].

2.9 Определение активности глутатион- S-трансферазы

«Принцип метода: активность глутатион-S-тансферазы определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ).

Реактивы:

1. 0,1 М калий-фосфатный буфер, pH = 6,5
2. 0,015 М раствор GSH

3. Абсолютный метанол
4. 0,015 М раствор ХДНБ, приготовленный на абсолютном метаноле

Ход определения:

Плазму смешивают с охлажденной до 0°C водой в соотношении 1:20. В кювету с длиной оптического пути 1 см помещают 2,5 мл калий-фосфатного буфера, рН=6,5. Добавляют 0,2 мл раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл гемолизата. Реакцию инициируют внесением в кювету 0,2 мл раствора ХДНБ. Перемешивают и зануляют прибор. Регистрацию оптической плотности проводят в течение 3 минут при температуре 25 °С и длине волны 340 нм. Активность фермента рассчитывают, используя коэффициент миллимолярной экстинкции для GS-ХДНБ, равный 9,6 мМ⁻¹ * см⁻¹, и выражают в микромолях образующихся глутатион-S-конъюгатов в минуту на грамм белка.

Активность рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{\frac{\Delta E}{\text{мин}} * V_{pc} * 1000}{\epsilon * V_{np} * Pr}, \text{ где:}$$

A – активность фермента, моль\мин на г Pr.

ΔE – изменение оптической плотности в мин.

d – толщина кюветы (1 см)

ε – коэффициент молярной экстинкции при λ=340 нм (9600 М⁻¹*см⁻¹)

V_{пр.} – объем пробы, используемый для определения активности GST

V_{р.с.} – объем реакционной смеси» [57].

2.10 Определение содержания мочевой кислоты в плазме крови

«Содержащаяся в пробе мочевая кислота окисляется под действием фермента уриказы с образованием перекиси водорода. В присутствии пероксидазы перекись водорода окисляет хромогены с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации мочевой кислоты в пробе.

Мочевую кислоту определяли с помощью специального набора реагентов

для определения концентрации мочевой кислоты в биологических жидкостях энзиматическим колориметрическим методом (набор «витал»).

Реактивы:

1. Реагент №1- фосфат (150 ммоль/л); 3,5-дихлоро-2-фенолсульфонат (2,5ммоль/л).
2. Реагент №2- 4-аминоантипирин (0,25ммоль/л); уриказа (300 ед/л); аскорбатоксидаза (250ед/л); пероксидаза (250 ед/л).
3. Калибратор – мочевая кислота (357 мкмоль/л).

Ход определения:

В опытную пробу, калибровочную пробу и холостую наливаем рабочий реагент (2,0 мл). Рабочий реагент: содержимое флакона с Реагентом №2, аккуратно перемешать и растворяем в буферном растворе Реагент №1. для получения оптимальных результатов выдерживаем рабочий реагент при комнатной температуре 5-10 мин. Далее в опытную пробу наливаем образец (0,05 мл), в калибровочную пробу набираем (0,05 мл) калибратора и в холостую наливаем (0,05 мл) дистиллированной воды.

Пробы тщательно перемешать, инкубировать 5 мин в термостате. Оптическую плотность опытной и калибровочной пробы измеряли против холостой пробы в кюветах 1,0 см и при длине волны 520 нм.

Расчетная формула:

$$C = \frac{E_o}{E_k} * 357, \text{ где}$$

C – концентрация мочевой кислоты в мкмоль/л;

E_o – оптическая плотность опытной пробы;

E_k – оптическая плотность калибратора;

357 – коэффициент пересчета» [57].

2.11 Определение содержания белка в плазме крови

Принцип метода: белок образует окрашенный комплекс с ионами меди в

щелочной среде. Интенсивность окраски при длине волны 540 нм прямо пропорциональна концентрации общего белка в пробе.

Определение содержания общего белка в плазме крови проводили с помощью набора «Витал», в который входит:

1. №1 Биуретовый реагент- 2×100 мл
 - Натрия гидроокись - 0,5 моль/л
 - Калий-натрий виннокислый – 80ммоль/л
 - Калий йодистый - 75ммоль/л
 - Сульфат меди – 30 ммоль/л
2. Калибратор 1×2,0 мл
 - Альбумин сывороточный – 70г/л
 - Натрий хлористый – 154 ммоль/л

Приготовление рабочего реагента – разводим необходимое количество реагента №1 бидистиллированной или деионизированной водой в 5 раз (1 часть реагента + 4части воды).

Стабильность рабочего реагента составляет не менее 6 месяцев при температуре 18-25°C, в темном месте, в плотно закрытой посуде. Не использовать рабочий реагент, если его оптическая плотность против воды более 0,2 (кювета -1см, длина волны 540 нм).

Ход определения:

В пробирки вносится рабочий реагент по 5,0 мл (в опытную, калибровочную и холостую). В опытные пробирки добавляется плазма крови 0,1 мл. Затем в калибровочную пробу вносится калибратор 0,1 мл, и в холостую - 0,1 мл воды.

Пробы тщательно перемешиваются, инкубировать 30 мин при 18-25°C. Измерение оптической плотности опытной ($E_{оп}$) и калибровочной (E_k) проб против холостой пробы при длине волны 540 нм. Окраска стабильна не менее 30 минут после окончания инкубации при предохранении от прямого солнечного света.

Расчетная формула:

$$C = \frac{E_o}{E_k} * 70, \text{ где:}$$

C – концентрация белка в образце, выражается в г/л

E_o – оптическая плотность опытной пробы;

E_k – оптическая плотность контрольной пробы;

70 – коэффициент пересчета.

2.12 Статистическая обработка результатов

По результатам исследований была сформирована база данных, на основе которой производился статистический анализ с помощью пакета прикладных программ Statistica 13 и Microsoft Office Excel 2016. Обработку данных проводили с помощью методов описательной статистики: подсчета медианы и интервального разброса (C₂₅-C₇₅ процентиля). Достоверность различия двух независимых выборок оценивалась по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни (при $p < 0,05$).

3 Результаты исследования и их обсуждения

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК	–	Активные формы кислорода
АОС	–	Антиоксидантная система
ДГПЖ	–	Доброкачественная гиперплазия предстательной железы
ДК	–	Диеновые конъюгаты
ДТНБК	–	5',5'-дитио-бис-2-нитробензойная кислота
ДТС	–	Дигидротестостерон
ДФГ	–	2,4-динитрофенил гидразином
КОС	–	Коэффициент окислительного стресса
КП	–	Карбонильные производные
МДА	–	Малоновый диальдегид
МК	–	Мочевая кислота
ОМБ	–	Окислительная модификация белка
ПЖ	–	Предстательная железа
ПИН	–	Простатическая интраэпителиальная неоплазия
ПОЛ	–	Перекисное окисление липидов
ПРИ	–	Пальцевое ректальное исследование
ПСА	–	Простатического специфического антигена
ПФР	–	Пептидный фактор роста
РПЖ	–	Рак предстательной железы
СОД	–	Супероксиддисмутаза
ТБК	–	2-тиобарбитуровая кислота
ТНФА	–	Тионитрофенильный анион
ТРУЗИ	–	Трансректальное ультразвуковое исследование
ЦП	–	Церулоплазмин
GSH	–	Восстановленный глутатион
GPO (ГПО)	–	Глутатионпероксидаза
GST (ГСТ)	–	Глутатион-S-трансфераза

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Шевелькова, А. А. Окислительная модификация белков и содержание тиолов в крови при физиологически протекающей беременности. / А. А. Шевелькова, А. В. Вьюшина // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т. 61., №4. – С 109-112.
2. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах. / Ю. А. Владимиров // Соровский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6., № 12. – С. 13-19
3. Надеев, А. Д. Активные формы кислорода в клетках сердечно-сосудистой системы. / А. Д. Надеев, Н. В. Гончаров // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2014. - № 4. – С. 80-94.
4. Hatem, E. Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. / E. Hatem, [et. al] // Free Radical Biology and Medicine. – 2014. - Vol. 75. – P.25-26.
5. Гривенникова, В. Г. Генерация активных форм кислорода митохондриями. / В. Г. Гривенникова, А. Д. Виноградов // Успехи биологической химии. – 2013. – Т.53. – С. 245-296.
6. Пожилова, Е. В. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки. / Е. В. Пожилова, В. Е. Новиков, О. С. Левченкова // Вестник смоленской государственной академии. – 2015. – Т. 14., № 2. – С. 13-21.
7. Узбеков, М.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях. / М. Г. Узбеков // Социальная и клиническая психиатрия. – 2014. – Т. 24., № 4. – С. 97-103.
8. Burton, G. J. Oxidative stress. / G. J. Burton, E. Jauniaux // Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology. – 2011. - № 25. – P.287-299.
9. Кулинский, В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред, защита. / В. И. Кулинский // Соровский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2-7.

10. Bhattacharyya, A. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. / A. Bhattacharyya, [et. al] // *Physiological Reviews*. – 2014. - №94. – P.329-354.
11. Новиков, В. Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция. / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова, Е.В. Пожилова // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2014. – Т. 12., № 4. – С. 13-21
12. Isoda, R. The role of protein oxidative modification in periodontal diseases. / R. Isoda, K. Matsushita. – New York- springer, 2014.- P. 15-32.
13. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. / Е.Б. Меньщикова [и др.] – Москва. - Слово, 2006. — 556 с.
14. Мартусевич, А. К. Оксидативный стресс и его роль в формировании дизадаптации и патологии. / А. К. Мартусевич, К. А. Карузин // *Биорадикалы и антиоксиданты*. – 2015. – Т. 2., № 2. – с. 5-14.
15. Муравлева, Л.Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования. / Л. Е. Муравлева [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2010. – № 1. – С. 74-78.
16. Губский, Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз: монография. / Ю. И. Губский. - Винница. - Нова книга, 2015. - 360с.
17. Södergren, E. Lipid peroxidation in vivo: Evaluation and application of methods for measurement./ E. Södergren. – Uppsala. - Acta Universitatis Upsaliensis, 2000. - P. 78.
18. Birben, E. Oxidative stress and antioxidant defense. / E. Birben [et. al] // *The World Allergy Organization journal*. – 2012. - № 5. – P. 9-19.
19. Pizzino, G. Oxidative stress: harms and benefits for human health. / G. Pizzino [et. al] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2017. – Vol. 2017. – 13p.
20. Ayala, A. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. / A. Ayala, M. F.

Muñoz, S. Argüelles // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. –Vol. 2014. – 31p.

21. Янковский, О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы. / О.Ю.Янковский. СПб. – Игра, 2000. – 294с.

22. Rahal, A. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. / A. Rahal. *BioMed Research International*. – 2014.- Vol. 2014. – 19p.

23. Толпыгина, О.А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты. / О. А. Толпыгина // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. - 2012. № 2. С. 178-180.

24. Kurutas, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. / E. B. Kurutas // *Nutrition Journal*. – 2016. №15. – 22p.

25. Aitken, J. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. / J. Aitken, S. Roman. // *Oxidative medicine and cellular longevity*. - 2008. - №1. - P. 15-24.

26. Чанчаева, е. А. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека. / е. А. Чанчаева // *экология человека*. – 2013. - № 7. – с. 50-58

27. Pham-huy, L. A. Free radicals, antioxidants in disease and health. / L. A. Pham-huy, H. He, C. Pham-huy // *Int j biomed sci*. – 2008. - № 4.- P. 89-96.

28. Lobo, V. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. / V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra // *Pharmacogn rev*. – 2010. - № 4. – P. 118-126.

29. Birben, E. Oxidative stress and antioxidant defense. / E. Birben [et. al] // *World allergy organ j*.- 2012. - № 5. –P. 9-19.

30. Irshad, M. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. / M. Irshad, P. Chaudhuri // *Indian journal of experimental biology*. – 2002. – Vol. 40., № 11. – P. 1233-1239.

31. Rossi, R. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? / R. Rossi [et. al] // *Clinical chemistry*. – 2002. - № 5. P. 742–753.


32. Singh, M. Significance of the glutathione-s-transferase activity. / M. Singh // Journal of clinical and diagnostic research. - 2012. - Vol. 6, №1. - P. 31-33.
33. Hakuna, L. A simple assay for glutathione in whole blood. / L. Hakuna [et. al] // The royal society of chemistry. – 2015. - P.1
34. Sautin, Y. Y. Uric acid: the oxidant–antioxidant paradox. / Y. Y. Sautin, R. J. Johnson. // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. – 2008. - №27. – P. 608–619.
35. Галунская, Б. Двумикий Янус биохимии: мочевая кислота – оксидант или антиоксидант? / Галунская Б. [и др.]. // Нефрология. – 2004. - Т.8, №4. – С. 25-31.
36. Васильев, А.О. Доброкачественная гиперплазия предстательной железы: возможность применения ингибиторов фосфодиэстеразы 5-го типа. / А.О.Васильев [и др.]. // Урология. – 2016. - №19. – С. 109-113.
37. Джапаров, Ж.Т. Доброкачественная гиперплазия предстательной железы в сочетании с хроническим калькулезным простатитом. / Ж.Т. Джапаров [и др.]. // Вестник КРСУ. - 2017. – Т. 17, № 10. – С.26-28.
38. Филиппович, В.А. Доброкачественная гиперплазия предстательной железы: современный подход к медикаментозной терапии. / В.А. Филиппович. // Журнал ГрГМУ. – 2008. - №1. – С.93-101.
39. Foo, K. T. Solving the benign prostatic hyperplasia puzzle. / K. T. Foo. // Asian Journal of Urology. – 2016. - №3. – P.6-9.
40. Foo, K. T. Pathophysiology of clinical benign prostatic hyperplasia. / K. T. Foo. // Asian Journal of Urology. – 2017. - №4. – P.152-157.
41. Тюзиков, И.А. Роль возрастного андрогенного дефицита в патогенезе аденомы предстательной железы. / И.А. Тюзиков [и др.]. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2016. - № 1. – С. 14-18.
42. Mazhar, D Prostate cancer D. / Mazhar, J. Waxman. // Postgraduate Medical Journal. – 2002. - №78. – P. 590–595.
43. Merriel, S. Prostate cancer in primary care. / S. Merriel, G. Funston, W.Hamilton. // Advances in Therapy. – 2018. - № 35. – P. 1285–1294.

44. Onyema-iloh, B. O. Biochemical changes in some trace elements, antioxidant vitamins and their therapeutic importance in prostate cancer patients B. O. Onyema-iloh [et. al]. // Asian journal of medical sciences. – 2015. – Vol. 6. – P. 95-97.
45. Wozniak, A. Oxidative Stress Markers in Prostate Cancer Patients after HDR Brachytherapy Combined with External Beam Radiation. / A.Wozniak [et.al]. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2012. – Vol. 2012. – 5p.
46. Oh, B. Oxidative Stress in Prostate Cancer Patient: A Systemic Review of Case Control Studies. / B. Oh [et. al]. // Prostate international. – 2016. - № 4. – P. 71-87.
47. Chhabra, G. Prostate cancer chemoprevention by natural agents: clinical evidence and potential implications. / G. Chhabra [et. al]. // Cancer Lett. Author manuscript. – 2019. - №422. – 23p.
48. Аль-Шукри, С.Х. Рак предстательной железы: некоторые аспекты эпидемиологии, этиологии и канцерогенеза. / С.Х. Аль-Шукри, С. Ю. Боровец. // Урологические ведомости. – 2012. – Т.2, №1. – С.23-25.
49. Карпов, Е.И. Новые перспективы в профилактике рака предстательной железы. / Е.И. Карпов. // Урология. – 2015. - №26. – С. 1576-1578.
50. Хвастунов, Р. А. Рак предстательной железы. / Р. А. Хвастунов. // Вестник. – 2008. - №3. – С.3-8.
51. Shah, S.I.A. An update on the risk factors for prostate cancer. / S.I.A. Shah. // World cancer research journal. – 2016. - №3. – P. 1-5.
52. Ковылина, М.В. Патоморфологическая диагностика рака предстательной железы, рака мочевого пузыря и рака почки. / М.В. Ковылина, Е.А. Прилепская, Д.Ю. Пушкарь. – Москва. – АБВ-пресс, 2017. – 48с.
53. Mottet, N. Prostate cancer. / N. Mottet [et. al]. // European Association of Urology. – 2018. - №2. – 145p.

54. Рак предстательной железы: Руководства для врачей общей практики (семейных врачей) / Ассоциация врачей общей практики (семейных врачей) Российской Федерации. – Москва. – 2014. – 12с.
55. Malati, T. Prostate specific antigen in patients of benign prostate hypertrophy and carcinoma prostate. / T. Malati [et. al].// Indian Journal of Clinical Biochemistry. – 2006. - №21. – P.34-40.
56. Vasanwala, F. F. Benign prostatic hyperplasia and male lower urinary symptoms: a guide for family physicians. / F. F. Vasanwala [et. al].// Asian Journal of Urology. – 2017. - №4. – P.181-184.
57. Титова, Н. М. Оценка структурно-функционального состояния клетки: методические указания к практическим занятиям. / Н. М. Титова [и др.]. - Красноярск. - ИПК СФУ, 2009. - 60 с.
58. Rossi, R. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? / R. Rossi [et. al] // Clinical chemistry. – 2002. - № 5. P. 742–753.
59. Мартусевич, А.К. Антиоксидантная терапия: современное состояние, возможности и перспективы. / А.К. Мартусевич, К.А. Карузин, А.С. Самойлов. // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2018. – Т.5, №1. – С. 5-21.
60. Колесникова, Л.И. Коэффициент окислительного стресса у мужчин репродуктивного возраста при бесплодии. / Л.И. Колесникова [и др.]. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. - №5. – С. 72-75.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Е. И. Шишацкая
« 5 » июня 2019 г.


МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ про- и антиоксидантной систем в плазме крови больных аденомой и
раком простаты

06.04.01 Биология

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

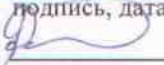
Научный руководитель

 доцент, к.б.н. Н. М. Титова
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник

 Е. А. Карпенко
подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент

 доцент, к.б.н. Р.Н. Белоногов
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2019